

ВЫХОД МИКРОФИЛЯРИЙ *THAMUGADIA IVASCHKINI* ИЗ КИШЕЧНИКА В ГЕМОЦЕЛЬ МОСКИТОВ РОДА *PHLEBOTOMUS*

Е. П. Резник, Л. А. Кузнецова

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

У экспериментально зараженных *Th. ivaschkini* москитов *Phlebotomus papatasi* и *Ph. caucasicus* изучены закономерности миграции микрофилярий из трофической полости в гемоцель в связи с процессами переваривания крови и изменения состояния перитрофической оболочки.

Установлено, что в организме этих переносчиков отсутствуют физиологические механизмы, сдерживающие выход микрофилярий из желудка и ограничивающие инвазию.

Известно, что процесс миграции личинок филярий из желудка в гемоцель переносчиков представляет собой один из критических этапов в жизненном цикле этих паразитов, на котором может осуществляться количественная регуляция последних. В одних случаях это выражается в ограничении числа личинок, проникших в гемоцель и способных продолжать развитие; в других, при отсутствии подобных ограничивающих факторов, — в гибели гиперинвазированных особей переносчика (Bain, Philippon, 1970; Пишон и др., 1975; Бэн, 1977, и др.). Конкретные механизмы, задерживающие или напротив облегчающие миграцию микрофилярий в организме отдельных видов промежуточных хозяев, довольно разнообразны и в настоящее время еще недостаточно изучены.

Как правило, выход микрофилярий в гемоцель кровососов начинается через 10—20 мин и завершается в течение нескольких первых часов после заражающего питания, однако в отдельных случаях он может продолжаться и более суток, причем для каждой пары видов (переносчик—возбудитель) характерна определенная скорость миграции (Сонин, 1966; Orihel, 1975, и др.).

Главными препятствиями для микрофилярий, покидающих кишечник членистоногого, являются свернувшаяся в желудке кровь, окружающая ее перитрофическая оболочка, кишечный эпителий и базальная мембрана. Установлено, что скорость коагуляции заглоченной крови (у комаров) (Nayar, Sauerman, 1975) и образования перитрофической оболочки (у мошек) (Bain, Philippon, 1970; Orihel, 1975) могут ограничивать время выхода паразитов из желудка, а следовательно, и число личинок, способных к последующему развитию в тканях переносчика. Показано, что клетки кишечного эпителия некоторых видов комаров способны реагировать на присутствие в трофической полости и выход из нее активных микрофилярий, увеличиваясь в объеме или выделяя вещества, препятствующие дальнейшей миграции гельминтов (Bain, Brengues, 1972; Bain, Chabaud, 1975, 1977). Существует мнение, согласно которому миграция паразитов у кровососущих двукрылых приурочена к участкам средней кишки с наименее растянутым эпителием, в клетках которого личинки могут задерживаться на неопределенно долгое время (до нескольких часов) прежде чем преодолеть базальную мембрану (Bain, Philippon, 1970).

Характерно, что большинство работ, в которых рассматривается процесс пересечения микрофиляриями кишечной стенки, связано с комарами и мошками — переносчиками широко известных филяриатозов человека и животных. Между тем исследование данного явления у широкого круга филяриат и их

промежуточных хозяев, относящихся к другим систематическим группам членистоногих, представляет несомненный теоретический интерес.

Изучая жизненный цикл *Thamugadia ivaschkini*, паразита ящериц сем. Gekkonidae, мы установили, что переносчиками этой филярии на юге Туркменской ССР служат москиты рода *Phlebotomus* и *Sergentomyia arpaclensis*, причем развитие гельминтов осуществляется в грудных мышцах насекомых (Резник, 1982). Различия в характере инвазии у представителей двух родов москитов позволили предположить, что процесс миграции микрофилярий из желудка в гемоцель протекает у них по-разному.

Цель настоящей работы — изучение способа и сроков выхода микрофилярий *Th. ivaschkini* в полость тела москитов рода *Phlebotomus* в связи с продолжительностью основных этапов переваривания крови и состоянием перитрофической оболочки в желудке этих переносчиков. Подобных исследований на промежуточных хозяевах филярий из подсем. Phlebotominae ранее не проводилось.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Процессы пищеварения и миграции паразитов изучали у экспериментально зараженных москитов. Опыты ставили на базе полевой лаборатории в пос. Имам-Баба Туркменской ССР.

Голодных москитов *Ph. papatasi* и *Ph. caucasicus* отлавливали в естественных биотопах эксгаустером на человеке. Источником инвазии в экспериментах служили гребнепалые гекконы (*Crossobamon evermanni*) из окрестностей пос. Имам-Баба, спонтанно зараженные филяриями.

Свежеотловленных насекомых прямо в эксгаустерах кормили на зараженных ящерицах (обычно между 23 и 24 ч), причем время конца кровососания каждой особи точно фиксировалось. Напившихся самок содержали в отдельных пробирках при естественных суточных колебаниях температуры в пределах 27—32° и относительной влажности воздуха 30—60%. Через разные промежутки времени после заражения их обездвиживали эфиром, отмечали фазу переваривания крови по Долматовой (1942); после чего — фиксировали целиком в жидкости Буэна или вскрывали в капле физиологического раствора, предварительно отделив голову для идентификации москита. При препаровке определяли консистенцию пищи в кишечнике, состояние перитрофической оболочки, количество личинок паразита, обнаруженных в желудке, полости брюшка и груди. Для изучения изменений состояния перитрофической оболочки в процессе пищеварения использовали критерии оценки, которые были приняты нами для кровососущих комаров (Кузнецова, 1977).

Продолжительность опытов ограничивалась периодом переваривания самками одной порции крови (от момента заражающего питания до полного освобождения кишечника). При фиксации и вскрытии были использованы только живые активные особи; случаи патологии москитов при интенсивной инвазии не рассматриваются в рамках настоящей работы.

Для гистологического изучения фиксированных москитов их обездвиживали в спиртах и заливали в парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином Карачи с докраской эозином и реактивом Гимза. Препараты фотографировали с микрофотонасадкой МФН-12 на пленку микрат-200.

Всего нами было обработано более 40 экз. москитов, относящихся к двум видам рода *Phlebotomus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Переваривание крови и изменение состояния перитрофической оболочки в процессе пищеварения. Изучение пищеварения и формирования перитрофической оболочки у зараженных и незараженных москитов показало, что присутствие в желудке и выход из него микрофилярий при умеренном уровне инвазии (до 100 личинок на 1 самку) не сказывается на течении описанных ниже процессов. У представителей видов *Ph. papatasi* и *Ph. caucasicus* эти процессы осуществляются сходным образом.

После поступления крови в среднюю кишку сразу же начинается интенсивное всасывание воды и расслоение пищи на жидкую фракцию и клетки. Примерно через 1—1.5 ч кровь свертывается, но довольно долго (до 8 ч) сохраняет ярко-красный цвет. Средняя продолжительность отдельных фаз пищеварения с момента кровососания оказалась следующей: II фаза — 1.5 ч (0—1.5 ч), III фаза — 16.5 ч (от 1.5 до 18 ч), IV фаза — 8 ч (от 18 до 26 ч), V фаза — 10 ч (от 26 до 36 ч) и VI фаза — 22 ч (от 36 до 58 ч).

Впервые изученные нами процессы образования и распада перитрофической оболочки у moskitov *Ph. papatasii* и *Ph. caucasicus* можно подразделить на следующие 8 стадий.

Предшественником перитрофической оболочки является вязкий непрозрачный неотделимый от пищи секрет клеток эпителия желудка, неровным по толщине слоем окружающей заглоченную кровь — 1-я стадия, длящаяся около 0.5 ч после питания москита. Затем на границе суженной и расширенной частей средней кишки наблюдается скопление секрета, занимающее воронкообразное расширение и часто соответствующее ему по форме, но меньших размеров. Подобное образование иногда можно видеть также на границе средней и задней кишки. Это так называемые пробки, закрывающие вход в трофическую полость и выход из нее во время переваривания крови. Их образование соответствует 2-й стадии, продолжающейся примерно 1 ч (от 0.5 до 1.5 ч после кровососания). Пробки представляют собой центры, откуда начинается затвердевание секрета, причем в задней части кишечника оно идет значительно интенсивнее. Сначала там образуется небольшой тонкий эластичный почти прозрачный колпачок, легко снимающийся со сгустка — 3-я стадия, занимающая около 1.5 ч (от 1.5 до 3 ч после кровососания). Затвердевание секрета продолжается по направлению к голове, колпачок охватывает более половины сгустка — 4-я стадия, длящаяся в среднем — 2.5 ч (от 3 до 5.5 ч после питания) и затем смыкается с небольшим участком секрета, затвердевшего около передней пробки. Таким образом, образуется замкнутый мешочек — прозрачный, эластичный плотно облегающий сгусток, легко снимающийся после рассечения, — 5-я стадия, продолжающаяся около 12 ч (от 5.5 до 17.5 ч после кровососания). Это образование представляет собой полностью сформированную перитрофическую оболочку. В таком виде она существует некоторое время, а потом постепенно (от заднего конца к переднему) начинает окрашиваться в коричневый цвет. Одновременно она теряет свою эластичность и становится хрупкой — 6-я стадия, длящаяся примерно 2.5 ч (от 17.5 до 20 ч после питания), и 7-я стадия, продолжающаяся в среднем 14 ч (от 20 до 34 ч со времени приема пищи). После этого оболочка начинает разрушаться и при снятии со сгустка в первое время разделяется на твердые кусочки разной величины, а затем — на мелкие, расплывающиеся при прикосновении, — 8-я стадия, длящаяся до 24 ч (от 34 до 58 ч после кровососания). В таком виде она сохраняется до конца пищеварения и выводится, видимо, вместе с остатками пищи.

М и г р а ц и я м и к р о ф и л я р и й. Сразу же после кровососания заглоченные микрофилярии начинают перемещаться на периферию трофической полости и концентрируются главным образом в поверхностном слое крови (в жидкой ее фракции) и среди выделенного клетками кишечного эпителия секрета (рис. 1, 3; см. вкл.). Одновременно личинки, расположенные ближе к внутренней поверхности эпителия, проходят через него, причем процесс пересечения кишечной стенки занимает у них несколько минут. Первые паразиты обнаруживаются в полости брюшка (вне кишечника) уже через 10—15 мин после питания, а спустя 5—6 ч в трофической полости остаются обычно единичные особи микрофилярий. Основная масса личинок мигрирует из желудка в первые 1.5—2 ч (рис. 1, 4, 5), а те из них, которые еще не успели за это время преодолеть кишечный эпителий, в большинстве своем располагаются у его внутренней поверхности, покинув сгусток свернувшейся крови.

Проходя через стенку желудка, микрофилярии совершают активные червеобразные движения. Они могут выходить в гемоцель в любом месте; какой-либо приуроченности миграции к определенным участкам средней кишки мы не наблюдали. Нам не удалось также обнаружить внутриэпителиальную фазу паразита. В первые часы после кровососания личинки довольно часто встречаются

в полости суженной части средней кишки (рис. 1, 1, 2). В этом случае они, по-видимому, могут непосредственно оттуда выходить в гемоцель вблизи от крыловых мышц (рис. 1, 2).

Вышедших в полость тела паразитов можно одновременно встретить по всему брюшку, а через 45—60 мин — среди мышц груди и затем — в самих мышцах (рис. 1, 6), где они вскоре начинают свое дальнейшее развитие. По окончании миграции гельминтов из трофической полости (через 5—6 ч после кровососания) в организме москита наблюдается следующая картина их распределения: часть мышц груди и ног поражена развивающимися личинками, в полости тела от груди и до задних сегментов брюшка располагаются подвижные микрофилярии, в трофической полости остаются единицы малоподвижных или совсем неподвиж-

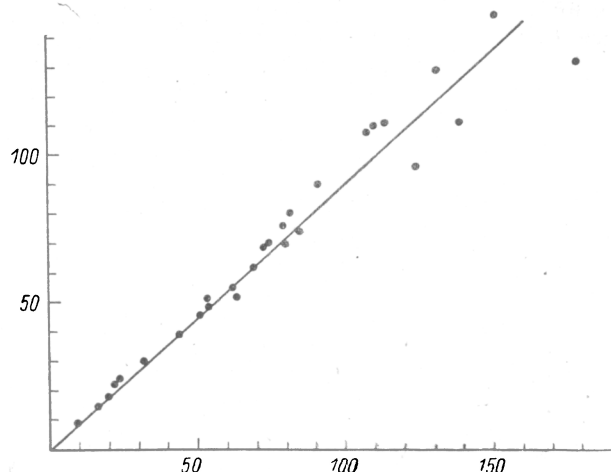


Рис. 2. Соотношение между числом микрофилярий, заглоченных москитами, и числом личинок, проникших в гемоцель, при разных уровнях зараженности.

По оси абсцисс — число личинок, заглоченных москитами; по оси ординат — число личинок, проникших в гемоцель москита.

ных микрофилярий, которые затем постепенно перевариваются. К концу срока переваривания крови (через 58 ч после питания) большинство паразитов локализуется в мышцах и значительно видоизменяется, однако часть живых и активных микрофилярий продолжает существовать в разных отделах гемоцеля, не приступая к дальнейшему развитию.

Описанное распределение личинок и сроки их миграции были отмечены при всех уровнях зараженности москитов. Подсчет микрофилярий при вскрытии живых самок показал, что, питаясь на гекконах с различной плотностью микрофилярий в крови, они могут заглатывать разное количество паразитов (от 5 до 320 экз. в наших экспериментах). В большинстве случаев (у 70% самок) число заглоченных личинок не превышало 100 экз. Около 21% самок содержало в своем организме от 100 до 150 паразитов. Уровни инвазии от 150 до 200 личинок и больше 200 личинок встречались довольно редко (у 5 и 4% самок соответственно).

Соотношение между числом паразитов, заглоченных москитом, и количеством личинок, проникших в гемоцель, было определено у самок по истечении срока миграции микрофилярий из кишечника, т. е. спустя 7 ч и более после заражающего питания. При разных количествах заглоченных микрофилярий (от 9 до 180 экз.) это соотношение оставалось примерно на одном и том же уровне; доля паразитов, достигших гемоцеля переносчиков, была высока — от 80 до 100% от числа личинок, попавших в трофическую полость москитов при кровососании (рис. 2). В среднем у 28 изученных самок этот показатель составлял $9.15 \pm 5.7\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общее время переваривания порции крови и продолжительность отдельных фаз пищеварения у москитов в наших экспериментах практически совпадают с аналогичными данными, полученными Долматовой (1942) для *Ph. papatasi*

в таких же условиях. Сравнение продолжительности стадий существования перитрофической оболочки с длительностью фаз переваривания крови выявляет наличие связи изменений состояния оболочки с процессом пищеварения. Так, в течение II фазы переваривания крови оболочка проходит 1-ю и 2-ю стадии, за время III — 3—5-ю и начало 6-й, на IV фазу приходится конец 6-й и половина 7-й стадий существования перитрофической оболочки, на V — конец 7-й и начало 8-й, а VI фаза соответствует окончанию 8-й стадии.

Характерно, что пищеварение не нарушается присутствием в организме москитов значительного количества крупных паразитов, активно перемещающихся в трофической полости и прободающих стенку желудка.

Миграция микрофилярий из кишечника совпадает по времени с начальными этапами пищеварения и формирования перитрофической оболочки. Так, время выхода в гемоцель первых личинок (10—15 мин после кровососания) соответствует периоду интенсивной секреции пищеварительных ферментов (II фаза) и просекрета перитрофической оболочки (1-я стадия). К моменту образования сгустка крови (около 1.5 ч после питания, конец II фазы пищеварения) в нем остаются обычно только единичные микрофилярии, которые по той или иной причине оказались нежизнеспособными и не смогли выйти на периферию трофической полости, где в это время концентрируются паразиты, не успевшие еще пересечь кишечный эпителий. Весь процесс миграции (до 5—6 ч после питания) соответствует II и началу III фазам переваривания крови и заканчивается до образования полной затвердевшей перитрофической оболочки (1-я — начало 5-й стадии).

Таким образом, ни свертывание крови, ни перитрофическая оболочка, ни какая-либо специфическая реакция кишечного эпителия не препятствуют проникновению большинства заглоченных москитом рода *Phlebotomus* микрофилярий *Th. ivaschkini* в его гемоцель. Доля личинок, преодолевших кишечный барьер, не зависит от числа микрофилярий, попавших в желудок (рис. 2). Здесь мы встречаемся с явлением так называемой «пропорциональности» при прохождении микрофиляриями кишечной стенки (Бэн, 1977), причем коэффициент пропорциональности в данном случае близок к единице. Подобное явление описано, например, у кровососущих комаров *Aedes detritus*, потенциальных переносчиков *Dirofilaria repens* в Камарге (Бэн, 1977).

«Пропорциональность» представляет собой один из трех основных типов зависимости количества личинок, проникших в гемоцель, от числа заглоченных микрофилярий. Два других типа этой зависимости — «благоприятствование» и «лимитирование» предполагают соответственно увеличение и уменьшение доли личинок, вышедших из кишечника, при возрастании числа заглоченных микрофилярий. Эти закономерности были выявлены французскими специалистами при изучении миграции филярий в организме их двукрылых переносчиков — комаров и мошек (Bain, 1976; Бэн, 1977; Brengues, Bain, 1972; Bain, Chabaud, 1977, и др.).

Характерно, что у большинства изученных пар филярий и их естественных переносчиков миграция личинок в гемоцель осуществляется по принципу «лимитирования» или «пропорциональности» с низкими коэффициентами. Эти явления обусловлены наличием механизмов, ограничивающих инвазию членистоногих при попадании в их желудок большого количества паразитов. Биологический смысл подобного ограничения заключается в предотвращении гибели гиперинвазированных особей переносчика вследствие неспособности их организма справиться с высокой паразитарной нагрузкой.

С другой стороны, явлениям «благоприятствования» и «пропорциональности» с высокими коэффициентами обычно сопутствует повышенная смертность переносчиков при интенсивной микрофиляриемии в крови позвоночных хозяев, что мы и наблюдали у москитов рода *Phlebotomus*, зараженных *Th. ivaschkini* (Резник, 1982).

Л и т е р а т у р а

Бэн О. Проникновение микрофилярий через стенку желудка переносчика; применявшиеся методы исследования, эпидемиологическое значение. — Бюл. Всемирн. организ. здравоохр., 1977, т. 54, № 4, с. 941—945.

- Д о л м а т о в а А. В. Жизненный цикл *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1942, № 3, с. 52—70.
- К у з н е ц о в а Л. А. Методика выделения перитрофической оболочки и определение сроков ее формирования и распада у кровососущих комаров. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1977, № 1, с. 114—116.
- П и ш о н Г., П е р р о Г., Л е г р е Ж. Выход паразитов у переносчиков филяриатозов. — Бюл. Всемирн. организ. здравоохран., 1975, т. 51, № 5, с. 496—503.
- Р е з н и к Е. П. Переносчики филярии *Thamugadia ivaschkini* Annaev, 1976 (*Splendidofilariidae*) на юге Туркменской ССР. — Паразитология, 1982, т. 16, вып. 5, с. 390—394.
- С о н и н М. Д. Основы нематодологии. Т. 17. Филяриаты животных и человека и вызываемые ими заболевания. Ч. I. Апроктоидеи. М., 1966, Наука, 360 с.
- В а и н О. Traversée de la paroi stomacale du vecteur par les microfilaires; rôle dans l'équilibre des foyers de transmission de filarioses. — Bull. Soc. zool. France, 1976, t. 101, N 5, p. 993.
- В а и н О., Б р е н г у е с J. Transmission de la wuchereriose et de la sétariose bovine: étude histologique de la traversée de la paroi stomacale d'*Anopheles gambiae* A et d'*Aedes aegypti* par les microfilaires. — Ann. parasitol. hum. et comp., 1972, t. 47, N 3, p. 399—412.
- В а и н О., Ч а б а у д А. Le mécanisme assurant la régulation de la traversée de la paroi stomacale du vecteur par les microfilaires (*Dipetalonema dessetae* — *Aedes aegypti*) — C. R. Acad. Sc. Paris, 1975, t. 281, p. 1199—1202.
- В а и н О., Ч а б а у д А. Le mécanisme assurant la régulation de la traversée de la paroi stomacale du vecteur *Aedes aegypti* par les microfilaires *Dipetalonema dessetae*. — Ann. parasitol. hum. et comp., 1977, t. 52, N 1, p. 84—86.
- В а и н О., Ф и л и п п о н Б. Mécanisme de la traversée de la paroi stomacale par les microfilaires chez *Anopheles stephensi* et *Simulium damnosum*. — Ann. parasitol. hum. et comp., 1970, t. 45, N 3, p. 295—320.
- Б р е н г у е с J., В а и н О. Passage des microfilaires de l'estomac vers l'hémocèle du vecteur, dans les couples *Wuchereria bancrofti* — *Anopheles gambiae*, *W. bancrofti* — *Aedes aegypti* et *Setaria labiatopapillosa* — *A. aegypti*. — Cah. ORSTOM. Entomol. méd. et parasitol., 1972, t. 10, N 3, p. 235—249.
- Н а у а r J. K., S a u e r m a n D. M. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. — J. Insect. Physiol., 1975, vol. 21, N 12, p. 1965—1975.
- О р и х е л Т. С. The peritrophic membrane: its role as a barrier to infection of the Arthropod host. — In: Invertebrate immunity. Mechanisms of invertebrate vector-parasite relations. Ed. by K. Maramorosch, R. E. Shope. New York, 1975, p. 65—74.

THE MIGRATION OF MICROFILARIANS *THAMUGADIA*, *IVASCHKINI* FROM THE INTESTINE TO HAEMOCOEL OF SAND FLIES OF THE GENUS *PHLEBOTOMUS*

E. P. Reznik, L. A. Kuznetzova

S U M M A R Y

Sand flies of *Ph. papatasi* and *Ph. caucasicus* were experimentally infected with *Th. ivaschkini*. At daily fluctuations of air temperature from 27 to 32 °C and relative air humidity from 30 to 60% viable microfilarians migrate into haemocoel within the first 5—6 hours after the blood-sucking of vectors, before the peripheral membrane is completely formed. Most parasites leave the intestine before the formation of a blood clot, within the first 1.5 hour after feeding. The number of larvae overcoming the intestinal barrier (at studied levels of infection) does not depend on the number of devoured microfilarians and is close to 100%. Sand flies of the genus *Phlebotomus* lack physiological mechanisms limiting the migration of microfilarians from the intestine that causes a high mortality of these vectors at intensive infection.

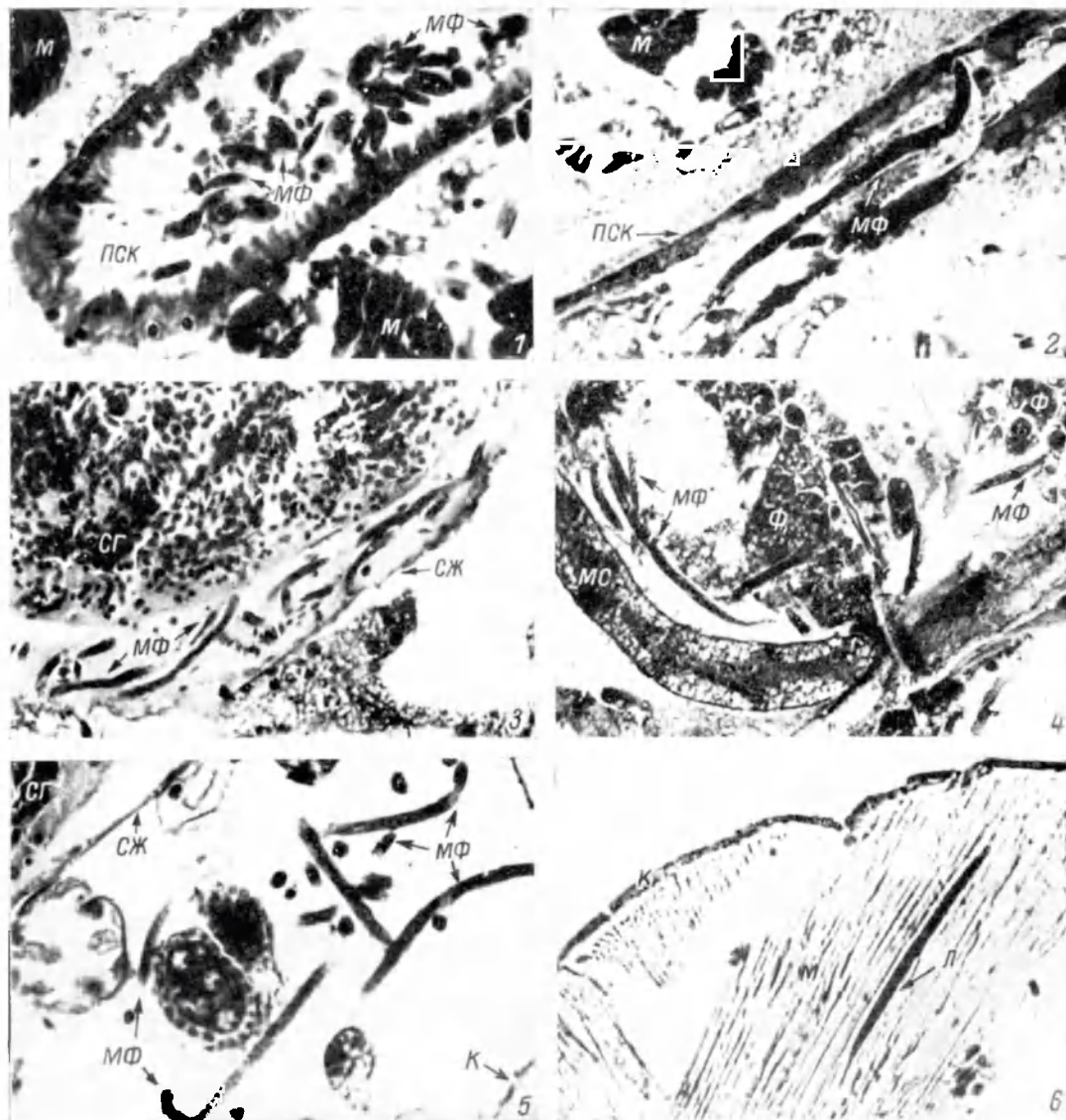


Рис. 1. Личинки *Th. ivaschkini* в организме москитов рода *Phlebotomus* на гистологических срезах.

1 — микрофилярии в переднем отделе средней кишки, ув. 600; 2 — выход микрофилярии из переднего отдела средней кишки, ув. 500; 3 — микрофилярии на периферии трофической полости, ув. 300; 4—5 — микрофилярии в гемоцеле москитов, ув. 300 (4), 500 (5); 6 — развивающаяся личинка в грудной мускулатуре, ув. 500. МФ — микрофилярии, Л — развивающиеся личинки, М — мышцы груди москита, МС — мальпигиевы сосуды, Ф — яичевые фолликулы, СГ — сгусток крови в желудке, СЖ — стенка желудка, ПСК — передний отдел средней кишки, К — кутикула москита.